Opusc. Zool. Budapest, XXII, 1986

Über die Darmaktinomyceten-Gemeinschaften einiger Regenwurm-Arten

Von

K. Ravasz*, A. Zicsi**, E. Contreras*, V. Széll*** und I. M. Szabó*

Abstract. The composition and properties of intestinal actinomycete communities of five earthworm species *(Lumbricus polyphemus, Fitzingeria platyura depressa, Allolobophora rosea, Octolasium montanum* and *Eisenia lucens)* were studied. The gut actinomycete flora (17–79% of the total gut flora) of these animals is mostly composed of *Streptomyces* spp. Some of them, such as *S. olivaceus* and *S. antibioticus* proved to be especially frequent member of worm-gut communities. Many others occurred less frequently or only sporadically. Streptomycetes characterized by ornamented spore surfaces (spiny or hairy) are rare elements of the gut actinomycete flora. The numbers and plate counts of melanoid-positive *Streptomyces* spp. are in the faecal matter of these worms relatively low. In the fresh excrements of adult specimens of *L. polyphemus* enormous numbers of a facultative anaerobic, actively moving nocardoid actinomycete of *Oerskovia* type were detected. Only *Streptomyces* gut-strains produced antibiotics, mostly active against *Bacillus subtilis*. Gut strains of *S. olivaceus* proved to be very active antagonists.

Die Zusammensetzung von Mikrobengemeinschaften in verschiedenen Regionen des intestinalen Milieus von Regenwürmern und in den von ihnen frisch abgelegten Kotballen sowie die mikrobiellen Selektionsvorgänge, die sich im Darm dieser Tiere vollziehen, erweckte seit lange her das Interesse der Wissenschaftler. Es stehen uns derzeit zahlreiche grundlegende Arbeiten über diese Vorgänge zur Verfügung, zuletzt wurde ein zusammenfassendes Referat von Satchell (1983) bekanntgegeben. In den letzten 50 Jahren haben mehrere Verfasser schon darauf hingewiesen, dass die Aktinomyceten, diese Mycelien bildenden Bakterien, im Darmtrakt der Regenwürmer eine bedeutende Rolle spielen (Schütz und Felber, 1956; Brüsewitz, 1959; Parle, 1963, etc). Wie beobachtet werden konnte, bildet der Darm einen wahren Brutschrank, wo sie sich viel schneller vermehren können, als im Boden. Über die Artenzusammensetzung der Darmaktinomyceten-Gemeinschaften stehen uns heutzutage leider nur sehr wenige Angaben

* *Kinga Ravasz, Enrique Contreras, Dr. István M. Szabó,* ELTE Mikrobiológiai Tanszék (Department of Microbiology of the Eötvös Loránd University), 1088 Budapest, Múzeum-krt. 4/a;
** *Dr. András Zicsi,* ELTE Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék (Zoosystematical and Ecological Institute of the Eötvös Loránd University), 1088 Budapest, Puskin-u. 3;
*** *Dr. Valéria Széll,* Gyógyszerkutató Intézet (Pharmaceutical Research Institute), 1045 Budapest, Szabadságharcosok útja 47–49.

zur Verfügung, obwohl solche Informationen zum besseren Verständnis der Darmvorgänge bei diesen Tieren unentbehrlich wären. Wahrscheinlich liegt dies daran, dass sich die Identifikationsmethoden der Streptomyceten, die die häufigsten darmbewohnenden Aktinomyceten der Regenwürmer sind, nur im Laufe der 70-er Jahre zu dem Niveau entwickelten, welches detaillierte taxonomische Analysen von reichen Artengemeinschaften ermöglichte.

In den vergangenen Jahren wurden am Lehrstuhl für Mikrobiologie und am Lehrstuhl für Tiersystematik und Ökologie der Eötvös-Loránd-Universität gemeinsame Untersuchungen hinsichtlich der Darmaktinomyceten-Gemeinschaften und deren abweichender Zusammensetzung in verschiedenen Regenwurm-Arten in Gang gesetzt. Die vorausgehenden zoologischen Untersuchungen, die sich auf die Wahl und auf die Menge des jährlichen Konsums verschiedener streuzersetzenden Lumbriciden-Arten bezeg (vergleiche Tabelle 1 und 2 sowie ZICSI, 1975, 1977, 1978; ZICSI, HARGITAI und POBOZSNY, 1971; ZICSI und POBOZSNY, 1977), veranlasste uns für die erste Serie unserer Untersuchungen Exemplare zweier streuzersetzender Arten zu wählen; es sind dies: *Lumbricus polyphemus* (Fitzinger, 1833) und *Fitzingeria platyura depressa* (Rosa, 1893). Diesen wurden zwei mineralbodenbewohnende Arten gegenübergestellt, die sich direkt nicht an der Zersetzung der Laubstreu beteiligen: es sind dies; *Allolobophora rosea* (Savigny, 1826) und *Octolasium montanum* (Wessely, 1905).

Material und Methode

Die Fütterungsversuche der in Tabelle 1 und 2 angeführten Arten sind unter Verhältnissen, die den natürlichen am nächsten stehend beurteilt wurden, im Höhlenbiologischen Laboratorium der Baradla-Höhle in Aggtelek durchgeführt worden. Hier beträgt die relative Luftfeuchtigkeit das ganze Jahr hindurch $100 \pm 2-3\%$. Die Temperatur 10 ± 1 C°.

Die Fütterungsversuche mit den verschiedenen Laubarten erfolgte in verschieden grossen, 0,50 m, 1 m und 1,5 m Höhe und 25×25 cm² Grundflächen betragenden, aus Aluminiumrahmen bestehenden Monolithen, in die den 4 Seiten entsprechend Glasscheiben eingelassen werden konnten. Als Futter wurde immer das im vorausgehenden Monat in Freien gelegene Fallaub verabreicht und monatlich wegen der grossen Entfernung von Budapest nur einmal betreut. Deswegen wurde von einer Blattart immer mehr Nahrung angeboten als in einem Monat konsumiert werden konnte, so dass die monatlich zurückgebliebenen Streureste sorgfältig wieder abgelesen und zurückgewogen wurden. Diese Untersuchungen wurden mit 4 Versuchstieren in 3 Parallelversuchen durchgefürt.

Für die bakteriologischen Untersuchungen wurden die Tiere von einer ungefähr 3000 m² grossen, relativ homogenen Versuchsfläche eines Hainbuchen-Eichenwaldes auf lessivierten braunen Waldbodentyp im Pilis-Gebirge nördlich von Budapest gesammelt. Von 3 bis 10 Exemplare pro Art wurden an Ort und Stelle Darminhalt-Proben unter aseptischen Verhältnissen genommen, die wegen Keimzahlbestimmung und Isolation, in sterilen Petrischalen gekühlt, rasch ins Laboratorium transportiert wurden.

Juvenile Exemplare wurden nur von einer Art und zwar von *L. polyphemus* separiert untersucht und gewertet. Ausserdem wurden frische Kotballen einiger früher schon im Laboratorium auf verschiedenen Substanzen (Gemisch von Baum-

rinde-Sägemehl und Rinderkot) gezüchteter *E. lucens*-Exemplare zu den vergleichenden mikrobiologischen Analysen herangezogen. Letztere deswegen, um zu klären, welche Wirkung die inadequate Züchtung von *E. lucens* auf die Zusammensetzung der normalen Darmmikroflora ausübt. Die Zusammensetzung der Darmmikroflora von der auf natürlichem Substrat (morschem Holz) lebenden *E. lucens* wurde bereits von MÁRIALIGETI (1979) und CONTRERAS (1980) geklärt.

Aus den homogenisierten Kotballen- bzw. Darminhalt-Proben, die von identifizierten Individuen genommen wurden, sind Verdünnungsserien hergestellt worden, die auf Glyzerin-Arginin-Agar und Stärke-Agarplatten geimpft wurden. Im Falle von *E. lucens* wurde auch aus dem in Wasser suspendierten Kotballen-Material auf Nähr-, Kasein-Stärke- und Kasein-Glukose-Agarplatten geimpft.

Nach 5- bzw. 14-tägiger Bebrütung im Thermostat bei 28°C wurden Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Dann wurden die gewachsenen Kolonien in grosser Zahl und ohne Selektion auf Schrägagar übergeimpft, deren Zusammensetzung mit der zur Abimpfung angewandten Platten übereinstimmte. Auf diese Weise wurden insgesamt anderthalbtausend Aktinomyceten-Isolate gewonnen, die zuerst aufgrund ihrer wichtigsten kulturellen und morphologischen Eigenschaften – auch den einzelnen Regenwurm-Arten entsprechend – grob gruppiert wurden. Die grösste Zahl von Gruppen (12 + 1 heterogene Gruppe), die ähnliche Isolate zusammenfassen. konnten im Falle der Regenwurm-Art *O. montanum* festgestellt werden. Die niedrigste Zahl von Gruppen (4 + 1) und gleichzeitig auch die einseitigste Darmaktinomyceten-Flora wurden aus dem Darminhalt der juvenilen Exemplare von *L. polyphemus* nachgewiesen. Dann wurden von allen Aktinomycetenisolaten-Gruppen – die auch den verschiedenen Wurmarten entsprechen – repräsentative Stämme für weitere detaillierte Untersuchungen ausgewählt, Reinigungsverfahren unterworfen und nach den standardisierten Methoden des „International Streptomyces Project" (SZABÓ et al., 1975; SZABÓ und MARTON, 1976) sorgfältig studiert. Die Gesamtzahl der representativen Stämme betrug 262. Alle diese Stämme wurden geprüft, ob sie an Pridham-Gottliebschen synthetischem Medium die folgenden Kohlenstoffquellen verwerten können; Glucose, Arabinose, Saccharose, Fructose, Xylose, Raffinose, Rhamnose, Mannitol und i-Inositol. Die Fähigkeit zur Bildung melanoider Pigmente wurde auf Eisen-Pepton-Agar und Tyrosin-Agar geprüft. Die Typen der Sporophoren, die Zahl der Sporen in Sporenketten, die elektronenmikroskopische Morphologie der Sporenoberfläche, die mit Hilfe der „Tresner-Backus-Farbenrädern" (TRESNER und BACKUS, 1963) bestimmte Farbe der Sporenmasse, die Farbe des Substratmycel und deren diffundierende Exopigmente wurden auf Haferflocken-Agar, Glyzerin-Asparagin-Agar, anorganisches Salz-Stärke-Agar und Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar studiert und determiniert. Zur systematischen Bestimmung der einzelnen Stämme haben wir die ISP-Neubeschreibungen der Typenstämme der anerkannten *Streptomyces*-Arten, die Monographie von HÜTTER (1967) weiterhin den Bestimmungsschlüssel von SZABÓ und Mitarbeitern (1975) angewandt. In gewissen Fällen wurden spezielle diagnostische Merkmale bezüglich der repräsentanten Stämme gewisser Isolaten-Gruppen auch bestimmt.

Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Tabelle 1 und 2 ersichtlich, besteht in der Frasstätigkeit der beiden Regenwurm-Arten hinsichtlich des Nahrungsangebotes eine gewisse Kontinuität, wobei die leichtzersetzlichen Laubarten (Linde, Esche, Ahorn) gleich nach dem Laubfall, die schwerzersetzlichen (verschiede Eichen-Arten und Buche) im nächsten Jahr, Ende Sommer oder Anfang Herbst konsumiert werden können. Die Hainbuche selbst nimmt eine Zwischenstellung ein, insofern von den Vorzersetzungsprozessen abgängend – die von den klimatischen Bedingungen des Standortes bedingt sind – grössere Mengen dem Laubfall folgend im nächsten Frühjahr bzw. Anfang Sommer von den Tieren verzehrt werden können.

Da die Darminhalt-Proben im Herbst entnommen wurden, ist es anzunehmen, dass sich die beiden untersuchten Streuzersetzer, *L. polyphemus* und *F. p. depressa*, hauptsächlich von der Streu der im vergangenen Herbst gefallenen Eichen-Laubarten ernährt haben.

Aufgrund unserer Keimzahlbestimmungsergebnisse (Tab. 3) ist der relative Anteil der Aktinomyceten in der Darmflora der Regenwürmer ziemlich hoch (schwankt zwischen 17 und 79% im Falle auf Glyzerin-Arginin-Agar und zwischen 17 und 62% auf Stärke-Agar). Diese Tatsache wurde übrigens schon früher von mehreren Verfassern nachgewiesen (Parle, 1963; Schütz und Felber, 1956). Bei unseren Untersuchungen schwankt auf den 2 Nährmedien die Keimzahl der Aktinomyceten nicht vollständig konsequent. Die höchsten Zahlen, 3 Millionen pro 1 g frische Substanz wurde auf Glyzerin-Arginin-Agar bestimmt und zwar im Falle der Darminhalt-Proben von adulten *L. polyphemus*-Exemplaren. Die Ursache wurde rasch geklärt, und zwar dadurch, dass bei diesen Tieren die Mehrzahl der Aktinomyceten-Flora durch leicht zerfallende mycelienbildende Nokardioform-Organismen repräsentiert war. Übrigens sind die Darmaktinomyceten typische Streptomyceten, ausserdem kommen im Darm in geringerer Zahl auch Micromonosporen vor.

Die Artenzusammensetzung der einzelnen Darmaktinomyceten-Floren wurde mit Hilfe von 1617 Isolaten studiert. Letztere wurden aufgrund wichtiger kulturellen und morphologischen Eigenschaften in kleinere Gruppen von ähnlichen Isolaten eingeordnet und die Vertreter dieser Gruppe taxonomisch identifiziert. Zwecks Vereinfachung wurden aus allen Isolaten-Gruppen repräsentative Stämme (insgesamt 262) ausgewählt und eingehend untersucht. Die Verteilung nach Arten in diesen representativen Stämmen war die folgende: *Streptomyces olivaceus:* 78; *S. antibioticus:* 30; *S. levoris:* 15; *S. violaceoruber:* 22; *S. fradiae:* 15; *S. longisporoflavus:* 11; *S. griseoaurantiacus:* 10; *S. exfoliatus:* 5; *S. globisporus:* 6; *S. prasimus:* 5; Nokardioform-Organismen die untereinander taxonomisch identisch waren: 25; Micromonospora-typische Organismen: 17 und undeterminierte: 23. Interessant ist es zu bemerken, dass die häufigsten Arten (*S. olivaceus*, *S. antibioticus*, *S. levoris*, *S. violaceoruber*, *S. fradiae*, *S. longisporoflavus*, *S. griseoaurantiacus*, etc.), die im Darm vorkommen bzw. dort sich höchstwahrscheinlich vermehren können, glatte Sporen bildende Formen sind. Streptomyceten mit ornamentierten Sporen (Abb. 1 a–c) sind in Wurm-Darmtrakt selten.

Tabelle 4 zeigt die prozentuelle Verteilung der isolierten 1617 Aktinomyceten in Relation der Darminhalt-Proben der untersuchten Regenwurm-Arten. Die hier angegebene Verteilung der Isolaten widerspiegelt die relative zahlen-

Tabelle 1. Durchschnittlicher Konsum verschiedener Laubstreuarten durch Lumbricus polyphemus (Fitz.,) in mg/Tag auf 1 g Lebendgewicht berechnet

Monat	*Tilia platyphyllos*		*Fraxinus excelsior*		*Acer platanoides*		*Carpinus betulus*		*Quercus petraea*		*Quercus cerris*		*Quercus robur*		*Fagus silvatica*	
	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77
November	12,9	12,5	10,1	13,5	11,3	12,0	2,6	10,1	Ø*	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Dezember	15,9	29,3	17,4	23,5	17,3	19,6	3,9	13,4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Januar	17,7	–	19,6	–	12,9	–	1,5	20,0	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Februar	–	22,7	–	24,6	–	23,9	5,0	18,7	Ø	Ø	Ø	1,5	Ø	Ø	Ø	1,9
März	26,7	36,7	28,9	35,8	25,5	29,2	9,1	22,7	1,6	2,5	1,6	2,5	1,9	5,0	Ø	4,4
April	–	–	–	–	–	–	8,5	21,8	5,6	7,1	3,6	4,8	2,8	6,1	Ø	6,7
Mai	–	–	–	–	–	–	19,7	24,1	4,1	16,0	8,4	16,5	8,7	7,3	Ø	6,5
Juni	–	–	–	–	–	–	14,5	28,3	10,8	16,1	11,2	20,4	10,9	15,0	1,3	11,9
Juli	–	–	–	–	–	–	15,5	29,6	12,6	22,1	21,1	23,3	12,6	16,8	9,9	16,3
August	–	–	–	–	–	–	27,2	–	23,5	23,1	23,3	27,2	19,5	19,9	15,4	17,0
September	–	–	–	–	–	–	34,9	–	23,3	26,9	27,6	30,4	23,5	24,2	18,4	36,5

* Blattart wurde zum angegebenen Zeitpunkt nicht konsumiert.

Tabelle 2. *Durchschnittlicher Konsum verschiedener Laubstreuarten durch Fitzingeria platyura depressa (Rosa) in mg/Tag auf 1 g Lebendgewicht berechnet*

Monat	*Tilia platyphyllos*		*Fraxinus excelsior*		*Acer platanoides*		*Carpinus betulus*		*Quercus petraea*		*Quercus cerris*		*Quercus robur*		*Fagus silvatica*	
	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77	1975/76	1976/77
November	17,6	14,3	12,9	13,3	12,7	4,2	4,8	8,9	∅*	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Dezember	24,6	25,2	15,6	23,6	17,3	16,4	2,3	15,5	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Januar	28,8	–	25,4	–	20,7	–	3,3	21,1	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Februar	–	31,5	–	31,3	–	25,5	7,1	22,8	∅	∅	∅	∅	∅	3,3	∅	∅
März	28,7	39,6	35,3	33,2	29,3	26,1	8,3	24,1	0,7	2,5	0,8	2,7	1,6	5,1	∅	∅
April	–	–	–	–	–	–	6,1	27,5	2,2	6,8	1,2	2,2	1,2	5,4	∅	2,9
Mai	–	–	–	–	–	–	11,8	25,4	2,5	6,7	2,2	5,1	4,6	4,2	∅	2,1
Juni	–	–	–	–	–	–	19,8	25,2	7,6	15,6	10,9	16,6	9,3	22,4	∅	13,8
Juli	–	–	–	–	–	–	13,6	29,8	18,3	22,6	18,2	23,7	12,5	23,4	2,3	17,9
August	–	–	–	–	–	–	26,2	27,6	19,4	24,5	18,7	26,4	18,7	24,6	7,4	18,5
September	–	–	–	–	–	–	33,0	–	25,6	26,5	23,6	34,1	25,7	25,5	10,7	25,2

* Blattart wurde zum angegebenen Zeitpunkt nicht konsumiert.

Tabelle 3. Gesamtkeimzahl (x 10^6) der Bakterien und Aktinomyceten sowie der prozentuelle Anteil von Aktinomyceten in Kotballen bzw. im Darminhalt 5 verschiedener Regenwurm-Arten bestimmt auf zwei verschiedenen Medien mit Plattengussverfahren berechnet auf 1 g frische Kot- Substanz

Regenwurm – Arten	Anorganisches Salz – Stärke – Agar				Glycerol – Arginin – Agar			
	Bakterien	Aktino-myceten	Zusammen	Aktino-myceten %	Bakterien	Aktino-myceten	Zusammen	Aktino-myceten %
Eisenia lucens	1,91	0,59	2,50	24	0,30	0,29	0,59	50
Octolasium montanum	2,31	2,43	4,74	51	1,79	1,64	3,43	48
Lumbricus polyphemus juvenil	7,00	1,60	8,60	19	5,55	1,11	6,65	17
Lumbricus polyphemus adult	7,65	1,53	9,18	17	5,20	3,00	8,20	37
Fitzingeria platyura depressa	5,50	1,20	6,70	18	2,31	1,43	3,74	38
Allolobophora rosea	0,40	0,64	1,04	62	0,16	0,63	0,79	79

mässige Verteilung der Arten im Darminhalt, da die Isolation nicht auf selektiver, sondern „randomierter" Weise durchgeführt wurde. Es ist auffallend, dass im Darminhalt konsequenter Weise immer 1 oder 2 Arten dominierten, viele andere nur eine untergeordnete Rolle gespielt haben. So z.B. bei *Eisenia lucens S. olivaceus* (73% der Gesamtaktinomyceten-Population), bei den juvenilen *L. poli-*

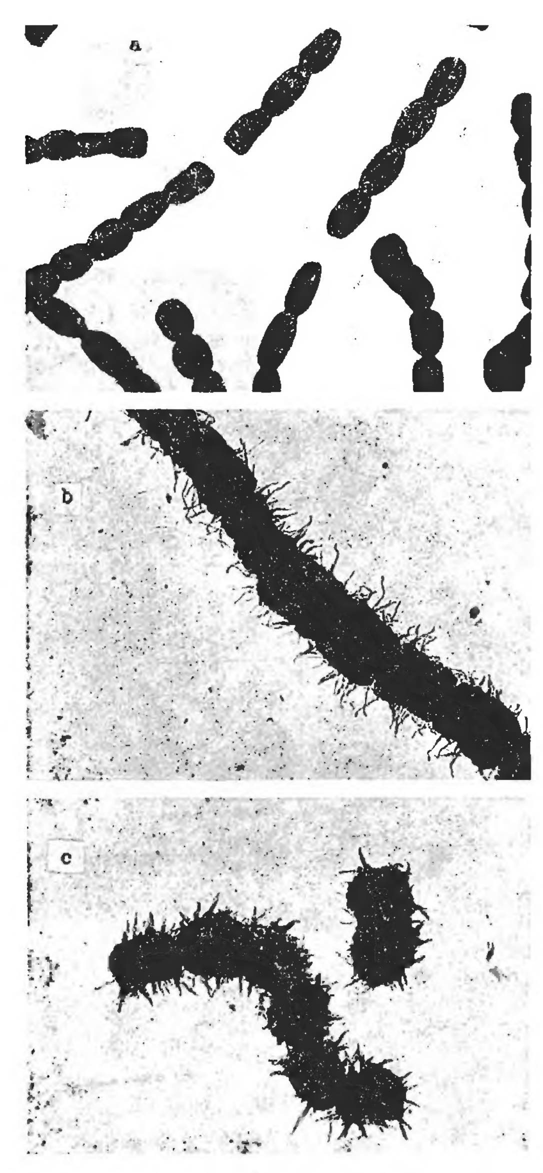


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen über maturierte Sporenketten aus dem Regenwurm-Darm isolierter *Streptomyces*-Stämme. *a:* Stamm EL – 272 *(S. levoris)*, glatte Sporen (8000×); *b:* Stamm AR – 31 (*S.* sp.), Sporen mit langem Stacheln und haarigen Auswüchsen bedeckt (8000×); *c:* Stamm OM – 227 *(S. prasinus)*, stachlige Sporen (8000×)

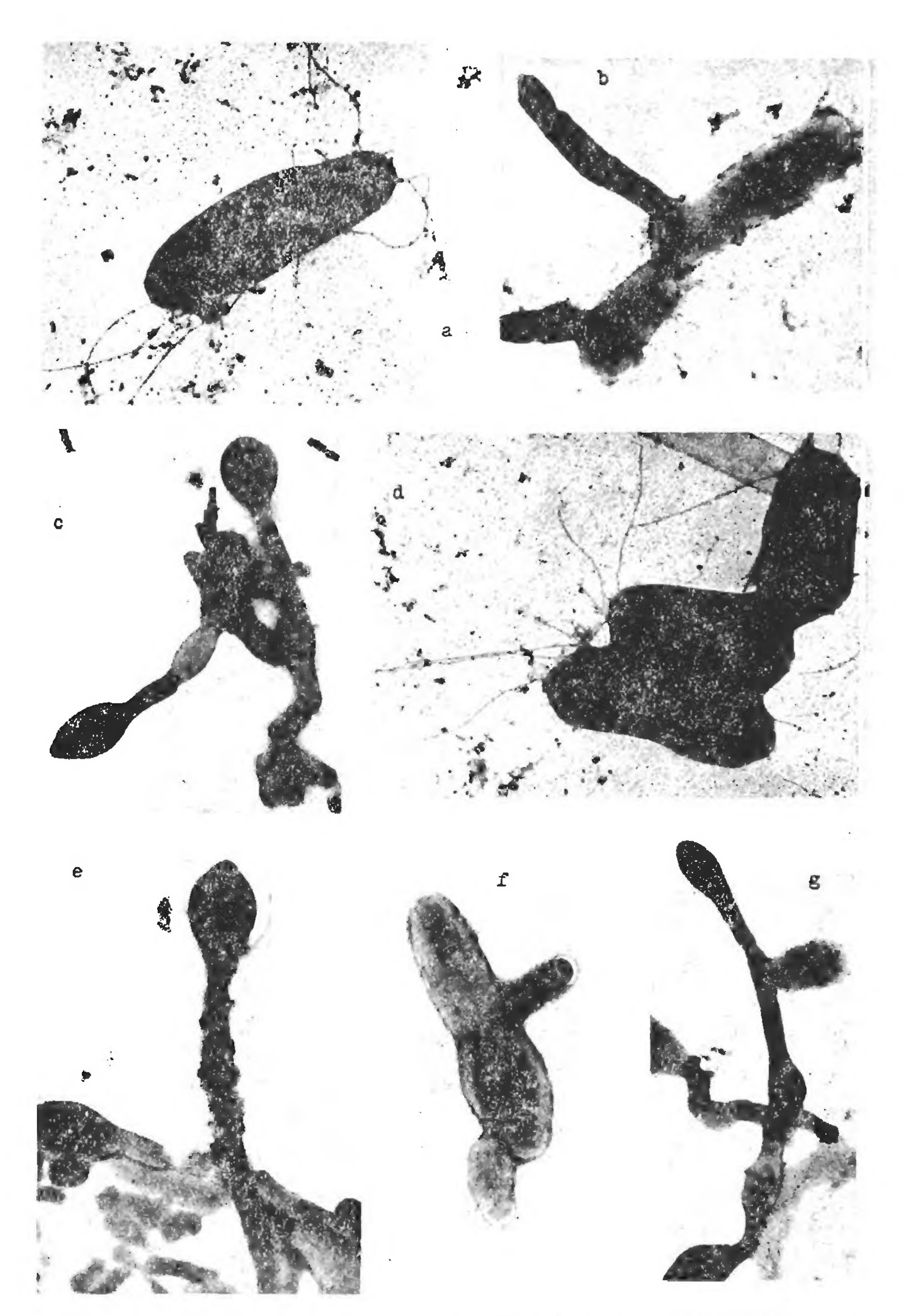


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen über begeisselte Zellen, zerfallende Fäden und sporenähnliche morphologische Gestalten von Nokardioform-Aktinomycetenstämme, isoliert aus dem Fäzes von adulten *L. polyphemus*-Exemplaren. *a:* Stamm LPA – 403; *b:* Stamm LPA – 359; *c:* Stamm LPA – 118; *d – e:* Stamm LPA – 118; *f:* Stamm LPA – 359; *g:* Stamm LPA – 118 (*a:* 16 000 ×;) *b:* 14 000 × ; *c:* 6600 × ; *d:* 22 000 × ; *e:* 8000 × ; *f:* 10 000 × ; *g:* 6600 ×)

Tabelle 4. Prozentuelle Verteilung der einzelnen Arten in den Darmaktinomyceten-Floren verschiedener Wurmarten, die aufgrund der Ergebnisse eines Vergleiches von 1617 Isolaten bzw. 262 selektierter representativen Stämme geschätzt wurde

Aktinomyceten – Arten	Regenwurm – Arten					
	Eisenia lucens	*Octolasium montanum*	*Lumbricus polyphemus juvenil*	*Lumbricus polyphemus adult*	*Fitzingeria platyura depressa*	*Allolobophora rosea*
Streptomyces olivaceus	70,9	35,8	24,3	6,6	12,9	55,4
S. olivaceus (viridogenes)	2,4	–	–	–	9,1	–
S. antibioticus	–	7,9	53,6	13,0	33,7	3,5
S. longisporoflavus	–	20,4	1,1	–	1,4	–
S. levoris	11,0	–	–	4,0	–	–
S. violaceoruber	–	5,1	–	–	12,8	7,8
S. fradiae	–	5,6	3,4	4,0	3,8	11,4
S. griseoaurantiacus	–	4,7	–	–	7,6	2,6
S. globisporus	–	1,5	2,0	–	0,7	–
S. prasinus	–	1,2	–	–	–	2,9
S. exfoliatus	–	1,7	–	4,0	–	–
Nocordioform species	–	–	–	60,4	–	–
Unbestimmte Aktinomyceten	15,7	16,1	15,6	4,0	17,9	16,4
Zusammen	100	100	100	100	100	100

phemus-Exemplare die Arten *S. antibioticus* und *S. olivaceus* usw. Tatsache ist es ferner noch, dass einige Arten, wie z.B. *S. olivaceus* und *S. antibioticus*, eine besondere Vorliebe für das Darmmilieu von Regenwürmern besitzen. *S. olivaceus* war auch in der Darmaktinomyceten-Flora von *Eisenia lucens* absolut dominierend, obwohl die Exemplare dieser Art im Laboratorium auf einem Gemisch von Baumrinde-Sägemehl-Rindkot gehalten wurden. Übrigens war die Zusammensetzung der Darmaktinomyceten-Flora von *E. lucens* abweichend von der, die früher von Contreras nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein Beweis dafür, dass die Selektionsprozesse unter vorübergehenden veränderten Umweltsverhältnissen im Endergebnisse bedeutende Abweichungen aufweisen können.

Eine unserer wichtigsten Feststellungen ist der Nachweis einer riesiggrossen Darm-Population von Nokardioform-Organismen (Abb. 2 a–g) im Darm von adulten Exemplaren der Art *L. polyphemus*. Solche gelb pigmentierte bakteroid Aktinomyceten – deren Identifikation in unserem Laboratorium in Gang gesetzt wurde – kommen im Darmtrakt als echte Darmbakterien in vielen wirbellosen Tieren vor (Dzingov et al., 1982; Szabó et al., 1983; Jáger et al., 1983; Márialigeti et al., 1985, etc.). Über ihre Beziehungen zu den Regenwürmern sind unsere Kenntisse unzulänglich. Unsere 25 Gram-positiven bzw. variable representativen Stämme erwiesen sich als fakultative anaerobe Organismen, die Glukose fermentieren können, ausserdem Gelatine und Stärcke sehr schwach hydrolisieren, Nitrate bis zu Nitriten reduzieren und Azetoin nicht produzieren können.

Tabelle 5 enthält Angaben über die von uns geschätzte Keimzahl der einzelnen Aktinomyceten-Arten im Darminhalt der untersuchten Wurmarten. Auffallend war die hohe Gesamtkeimzahl der Nokardioform-Organismen in adulten *L. polyphemus*-Exemplaren, wo sie nehezu 2 Millionen pro 1 g frische Darmin-

Tabelle 5. Annähernde, separate Gesamtkeimzahl einiger häufig vorkommender (dominierender) Aktinomyceten-Arten in Kotballen bzw. im Darminhalt der Untersuchten Exemplare bei verschiedenen Regenwurm-Arten

Regenwurm – Arten	Aktinomyceten – Arten	Gesamtkeizahl ($\times 10^6$) berechnet auf 1g frische Kotsubstanz	
		Stärke-Agar	Glyzerin – Asparagin – Agar
Eisenia lucens	*S. olivaceus*	0,43	0,21
	S. levoris	0,06	0,03
Octolasium montanum	*S. olivaceus*	0,87	0,58
	S. longisporoflavus	0,49	0,33
Lumbricus polyphemus	*S. antibioticus*	0,85	0,59
juvenil	*S. olivaceus*	0,38	0,27
Lumbricus polyphemus adult	*Nocardioform species*	0,92	1,81
	S. antibioticus	0,19	0,39
Filzingeria platyura depressa	*S. antibioticus*	0,40	0,48
	S. olivaceus	0,27	0,32
	S. violaceoruber	0,15	0,18
Allolobophora rosea	*S. olivaceus*	0,35	0,35
	S. fradiae	0,07	0,07

halt-Substanz betrug. Die Keimzahl der einzelnen *Streptomyces*-Arten ist aber im allgemeinen unter einer Million geblieben.

Die wichtigsten diagnostischen Merkmale der selektierten 262 repräsentativen Aktinomyceten-Stämme zeigt folgende Verteilung: Rhamnose positiv: 172; Raffinose positiv: 140; Xilose positiv: 238; Arabinose positiv: 198; Mannit positiv 187; Inosit positiv: 124; Saccharose positiv: 100; Glukose positiv: 256; Fruktose positiv: 237; Melanoid positiv: 67; farbige Kolonien bildende: 25; Substratmycelium in kokkoidalen oder stäbchenförmigen Elementen fragmentierend: 25; typisch spiralbildner: 97; Rectus-typische Sporophoren produzierend: 103.

Die Angaben über die Verwertungsmöglichkeiten von Kohlenstoffquellen zeigen eindeutig, dass sich im Darm physiologisch besonders aktive Stämme vermehren. Die Zahl der Melanoid-positiven Stämme ist verhältnismässig niedrig, obwohl einige Verfasser die Melanoid-Pigmente produzierenden Organismen für die vorübergehenden Humifikationsprozesse im Darm verantwortlich halten.

Tabelle 6 zeigt die Homogenität bzw. die Heterogenität der Darm-Populationen bei den einzelnen Aktinomyceten-Arten bezüglich ihres Verwertungsvermögen den geprüften verschiedenen Kohlenstoffquellen gegenüber die als einzige Energie- und C-Quelle dem Nährmedium beigegeben wurden. Die Population der isolierten achromogenen Varietät von *S. violaceoruber* war im Darmtrakt von *F. p. depressa* nahezu homogen, da alle Stämme auf allen C-Quellen, mit Ausnahme der Saccharose, ähnlicherweise gut gewachsen sind. Saccharose wurde nur durch einen einzigen *S. violaceoruber*-Stamm in diesem Habitat verwertet. Andererseits war die Darm-Population von *S. olivaceus* in *O. montanum* verhältnismässig heterogen, da die von hier isolierten Stämme dieser Art nur auf 3 C-Quellen (Raffinose, Xilose und Glukose) identisches Verwertunsvermögen zeigten. Im allgemeinen kann jedoch ausgesagt werden, dass die representativen Stämme der einzelnen Aktinomyceten-Arten, die aus dem Fäzes oder Darmin-

Tabelle 6. Zahl der aus dem Fäzes verschiedener Regenwurm-Arten isolierten und zu verschiedenen Aktinomyceten-Arten gehörenden Stämme, die die angegebenen C-Quelen verwerten können

Actinomyceten-Arten	Regenwurm-Arten	Gesamtzahl der Stämme	Kohlenstoff – Quelle								
			Rhamnose	Raffinose	Xilose	Arabinose	Mannit	Inosit	Saccharose	Glukose	Fruktose
Streptomyces olivaceus	*E. lucens*	18	10	0	15	18	18	10	0	18	18
	O. montanum	16	15	16	16	13	12	8	6	16	15
	L. polyphemus juv.	6	5	6	6	4	5	4	4	6	6
	L. polyphemus ad.	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2
	F. p. depressa	9	8	8	9	8	8	5	6	9	9
	A. rosea	17	15	16	16	17	14	11	11	17	17
Streptomyces olivaceus (viridogenes)	*E. lucens*	3	3	0	3	3	3	0	0	3	3
	F. p. depressa	3	3	0	3	3	3	0	1	3	3
Streptomyces antibioticus	*O. montanum*	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3
	L. polyphemus juv.	5	5	4	5	5	5	3	0	5	5
	L. polyphemus ad.	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5
	F. p. depressa	7	7	7	7	7	7	7	0	7	7
	A. rosea	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Streptomyces violaceoruber (achromogenes)	*O. montanum*	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4
	L. polyphemus ad.	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	F. p. depressa	10	10	10	10	10	10	10	1	10	10
	A. rosea	7	7	7	7	7	7	7	2	7	7

Streptomyces levoris	*E. lucens*	11	0	0	11	10	11	0	3	11	10
	L. polyphemus ad.	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
Streptomyces longisporoflavus	*O. montanum*	7	6	0	4	0	7	0	1	7	7
	L. polyphemus juv.	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
	F. p. depressa	2	2	1	2	1	2	0	0	2	2
Streptomyces globisporus	*L. polyphemus* juv.	2	2	0	2	1	2	0	0	2	2
	O. montanum	3	3	0	3	3	3	0	0	3	3
	F. p. depressa	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
Streptomyces fradiae sensu ISP	*O. montanum*	5	0	0	5	5	0	5	0	5	0
	F. p. depressa	3	0	2	2	2	0	2	1	3	0
Streptomyces fradiae sensu Hütter	*L. polyphemus* juv.	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	L. polyphemus ad.	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	A. rosea	4	0	4	3	3	0	4	4	4	4
Streptomyces exfoliatus	*E. lucens*	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	L. polyphemus ad.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	O. montanum	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	F. p. depressa	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Streptomyces griseoaurantiacus	*O. montanum*	2	2	2	1	0	0	0	2	2	2
	F. p. depressa	4	4	3	3	3	3	3	1	4	4
	A. rosea	3	2	1	3	0	0	0	2	3	3
Streptomyces prasinus	*O. montanum*	4	2	0	4	2	3	3	3	3	2
	A. rosea	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Nokardioform species	*L. polyphemus* ad.	25	4	0	25	10	2	1	25	25	25

*Tabelle 7. Die Verteilung und Aktivität der aus dem Fäzes verschiedener Regenwurm-Arten isolierten Antibiotika-produzierenden Aktinomyceten-Stämme**

Regenwurm-Arten	Gesamtzahl der untersuchten Stämme (Zahl der aktiven Stämme)	Aktive Stämme				
		Nummer der Stämme	Systematische Position	Aktivität (Einheit/ml)** gegenüber		
				Bacillus subtilis ATCC 6633		*Escherichia coli*
				pH 6,5	pH 8,0	pH 7,0
Allolobophora rosea	45 (6)	AR – 175	*Streptomyces* sp.	15,0	4,0	0,0
		AR – 150	*Streptomyces* sp.	10,0	0,5	0,0
		AR – 69	*S. violaceoruber*	1,5	0,0	0,0
		AR – 132	*S. olivaceus*	7,0	0,6	0,0
		AR – 249	*Streptomyces* sp.	1,5	3,5	0,0
		AR – 287	*S. violaceoruber*	0,8	0,8	0,0
Eisenia lucens	43 (21)	EL – 241	*Streptomyces* sp.	1,7	1,2	0,0
		EL – 219	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 68	*Streptomyces* sp.	1,0	0,7	0,0
		EL – 216	*Streptomyces* sp.	1,2	3,0	0,0
		EL – 130	*Streptomyces* sp.	3,0	1,8	0,0
		EL – 6	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 183	*S. olivaceus*	10,0	20,0	0,0
		EL – 232	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 272	*S. levoris*	3,0	5,0	0,0

		EL – 247	*S. levoris*	1,5	2,3	0,0
		EL – 263	*S. levoris*	2,3	1,8	0,0
		EL – 251	*S. levoris*	1,7	0,5	0,0
		EL – 246	*S. levoris*	1,3	0,8	0,0
		EL – 248	*S. levoris*	4,0	0,2	0,0
		EL – 243	*S. levoris*	3,0	0,2	0,0
		EL – 279	*S. olivaceus*	2,0	0,2	0,0
		EL – 199	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 145	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 030	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 182	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
		EL – 24	*S. olivaceus*	10,0	10,0	0,0
Fitzingeria platyura depressa	51 (4)	FPD – 49	*S. griseoaurantiacus*	0,9	0,7	0,0
		FPD – 204	*S. olivaceus (virid.)*	2,5	1,0	0,0
		FPD – 164	*S. longisporaflavus*	5,0	1,0	4,0
		FPD – 99	*Streptomyces* sp.	3,5	1,5	0,0
Lumbricus polyphemus adult	42 (2)	LPA – 65	*S. levoris*	0,0	0,9	0,0
		LPA – 49	*S. fradiae*	0,0	0,9	10,0
Lumbricus polyphemus juvenil	20 (4)	LPJ – 254	*S. olivaceus*	0,8	0,2	0,0
		LPJ – 309	*S. globisporus*	0,7	2,0	0,0
		LPJ – 159	*S. globisporus*	0,5	2,0	0,0
		LPJ – 269	*Streptomyces* sp.	0,3	0,9	0,0

Regenwurm-Arten	Gesamtzahl der untersuchten Stämme (Zahl der aktiven Stämme)	Aktive Stämme				
		Nummer der Stämme	Systematische Position	Aktivität (Einheit/ml)** gegenüber		
				Bacillus subtilis ATCC 6633		*Escherichia coli*
				pH 6,5	pH 8,0	pH 7,0
Octolasium montanum	59 (7)	OM – 272	*Streptomyces* sp.	7,0	0,0	0,0
		OM – 2	*Micromonospora* sp.	5,0	2,0	0,0
		OM – 271	*Streptomyces* sp.	5,0	2,5	0,0
		OM – 171	*S. longisporoflavus*	0,3	0,8	0,0
		OM – 144	*S. globisporus*	0,7	2,0	0,0
		OM – 66	*S. globisporus*	0,6	1,8	0,0
		OM – 145	*S. globisporus*	0,5	1,3	0,0

* Die biologischen Aktivitätsmessungen wurden auf Messplatten im Falle von B. *subtilis* als Testorganismus bei pH 6,5 und 8,0 druchgeführt. Es wurde die Messtechnik von Simpson (1963) angewandt.

** Eine Einheit der biologischen Aktivität = Antibiotika – Konzentration, die einen 20 mm breiten Hemmungsring verursachen kann.

halt ein und derselben Regenwurm-Art gezüchtet wurden, nahezu identische oder sehr ähnliche Kohlenstoff-Verwertungsspektren zeigten. Letztere können aber beträchtlich verschieden sein – auch unter denjenigen Stämmen, die artenmässig als identisch determiniert wurden – wenn die Stämme aus verschiedenen Tieren isoliert waren. So zeigten z.B. die aus dem Fäzes von *E. lucens* bzw. *O. montanum* isolierten Stämme von *S. olivaceus* prägnante Unterschiede in der Raffinose- und Saccharose-Verwertung, usw. Höchstwahrscheinlich leben und kolonisieren verschiedene Varietäten und Biotypen der inzelnen *Streptomyces*-Arten die Fäzespartikelchen im Darmtrakt der Regenwurm-Arten bzw. innerhalb der Arten, die der einzelnen Individuen.

Tabelle 7 zeigt Angaben über die antibiotische Aktivität der aus dem Darmtrakt der untersuchten Regenwurm-Arten isolierten und selektierten representativen Stämme. Es wurden insgesammt 260 Stämme gegenüber *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* als Testorganismen geprüft. Nur zwei Stämme zeigten Hemmwirkungen gegenüber *E. coli*. Dies waren die representativen Stämme der Arten *S. longisporoflavus* bzw. *S. fradiae*. Gegenüber *Bacillus subtilis* erwiesen sich 44 Actinomyceten-Stämme als aktiv. Die überwiegende Mehrheit der letzteren (21 Stämme) wurde aus dem Fäzes von *Eisenia lucens* gewonnen. Die Nokardioformen waren vollständig inaktiv. Diese Funde stimmen mit den Angaben der Literatur (MÁRIALIGETI et al. 1985, u.s.w.) überein. Unter den aus dem Fäzes isolierten *Streptomyces*-Stämmen zeichneten sich häufig mit antibiotischer Aktivität diejenigen aus, die zu der sogenannten "Griseus"-Gruppe gehören (*S. levoris*, *S. globisporus*, u.s.w.). Demgegenüber die aktivsten Antibiotika-Bildner des Regenwurm-Darminhaltes zu der Art *S. olivaceus*. Es ist nicht ausgeschlossen, das dieser Aktinomycet der zu den typischen Regenwurmdarm-Inhabitanten gehört, mit seinen Hemmstoffen die Zusammensetzung der Darmgemeinschaften wirksam regulieren kann.

Zusammenfassung

1. Die Darmaktinomyceten-Gemeinschaften der Würmer ist in meisten Fällen aus *Streptomyces*-Arten zusammengesetzt.

2. In einem Fall, bei adulten Exemplaren von *L. polyphemus*, wurde eine grosse Darm-Population der begeisselten Zellen und Fäden von fakultativ anaeroben, Glukose fermentierenden, antibiotisch inaktiven, gelb gefärbten *Oerskovia*-artige Nokardioform-Aktinomyceten angetroffen.

3. Der Anteil von Aktinomyceten in der gesamt aeroben und fakultativ anaeroben Mikrobenpopulation des Wurmdarminhaltes schwankt zwischen 17 und 79%.

4. Für einige *Streptomyces*-Arten erwies sich das Darmmilieu von Regenwürmern als besonders vorteilhafter Biotop. Es sind dies z.B. *S. olivaceus*, *S antibioticus* u.s.w.

5. Die Darmaktinomyceten-Gemeinschaften von Regenwürmern werden im allgemeinen von Populationen ein oder zwei dominierender und einiger mässig häufiger bzw. begleitender und von einer Reihe spurenweise vorkommender oder seltener Arten gebildet.

6. Streptomyceten mit ornamentierter Sporenoberfläche (haarige oder stachlige) kommen in Wurmdarmtrakt nur vereinzelt vor.

7. Die Melanoid-positiven Streptomyceten sind hinsichtlich ihrer Keim- und Typenzahl im Wurmdarmtrakt nicht im Vordergrund.

8. Unter den aus dem Wurm-Fäzes und -Darminhalt isolierten Aktinomyceten-Stämmen produzieren fast nur die Angehörigen des Genus *Streptomyces* antibiotische Stoffwechselprodukte. Die Mehrheit der Antagonisten, deren prozentuelle Menge 17% der untersuchten Stämme beträgt, erwies sich nur gegen *Bacillus subtilis* aktiv. Bezüglich vieler Fäzes-Stämme der Art *Streptomyces olivaceus*, die unter anderem auch typische Darmbewohner sind, wurde relativ intensive Antibiotika-Produktion nachgewiesen.

9. Die untersuchten Stämme der Darmpopulationen der einzelnen Aktinomyceten-Arten zeigten eine relative Homogenität bezüglich des Spektrums ihres Kohlenstoffverwertungsvermögens.

SCHRIFTTUM

1. BRÜSEWITZ, G. (1959): Untersuchungen über den Einfluss des Regenwurms auf Zahl, Art und Leistungen von Mikroorganismen im Boden. – Arch. Microbiol., 33: 52–82.
2. CONTRERAS, E. (1980): Studies on the intestinal actinomycete flora of Eisenia lucens (Annelida, Oligochaeta). – Pedobiologia, 20: 411–416.
3. DZINGOV, A., MÁRIALIGETI, K., JÁGER, K., CONTRERAS, E., KONDICS, L. & SZABÓ, I. M. (1982): Studies on the microflora of millipedes (Diplopoda). I. A comparison of actinomycetes isolated ted from surface structures of the exoskeleton and the digestive tract. – Pedobiologia, 24: 1–7.
4. HÜTTER, R. (1967): Systematik der Streptomyceten. – Bibl. Microbiol., 6. Basel–New York.
5. JÁGER, K., MÁRIALIGETI, K., HAUCK, M. & BARABÁS, G. (1983): Promicromonospora enterophila sp. nov., a new species of monospore actinomycetes. – Int. J. Syst. Bact., 33: 525–531.
6. MÁRIALIGETI, K. (1979): On the community-structure of the gut microbiota of Eisenia lucens (Annelida, Oligochaeta). – Pedobiologia, 19: 213–220.
7. MÁRIALIGETI, K., CONTRERAS, E., BARABÁS, G., HEYDRICH, M. & SZABÓ, I. M. (1985): True intestinal actinomycetes of millipedes (Diplopoda), – J. Invertebr. Pathol., 45: 120–121.
8. PARLE, J. N. (1963): Micro-organisms in the intestines of earthworms. – J. gen. Microbiol., 31: 1–11.
9. SATCHELL, J. E. (1983): Earthworm microbiology. – In Satchell, J. E. (ed.): Earthworm ecology, 351–364, London–New York.
10. SCHÜTZ, W. & FELBER, E. (1956): Welche Mikroorganismen spielen im Regenwurmdarm bei der Bildung von Bodenkrümeln eine Rolle? – Z. f. Acker- u. Pflanzenbau, 101: 471–476.
11. SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. (1966): Methods for characterization of Streptomyces species. – Int. J. Syst. Bact., 16: 313–340.
12. SZABÓ, I. M., JÁGER, K., CONTRERAS, E., MÁRIALIGETI, K., DZINGOV, A., BARABÁS, G. & POBOZSNY, M. (1983): Composition and properties of the external and internal microflora of millipedes (Diplopoda). – In Lebrun, Ph., André, H. M., De Medts, A., Grégoire, Wibo, C. & Wauthy, G. (eds.): New trends in soil biology, 197–207, Ottignies-Louvain-la-Neuve.
13. SZABÓ, I. M. & MARTON, M. (1976): Evaluation of criteria used in the ISP cooperative description of type strains of Streptomyces and Streptoverticillium. – Int. J. Syst. Bact., 26: 105–110.
14. SZABÓ, I. M., MARTON, M., BUTI, I. & FERNANDEZ, C. (1975): A diagnostic key for the identification of "species" of Streptomyces and Streptoverticillium included in the International Streptomyces Project. – Acta Bot. Acad. Sci. Hung., 21: 387–418.
15. TRESNER, H. D. & BACKUS, E. J. (1963): System of color wheels for streptomycete taxonomy. – Appl. Microbiol., 11: 335–338.
16. ZICSI, A. (1975): Zootische Einflüsse auf die Streuzersetzung in Hainbuchen-Eichenwäldern Ungarns. – Pedobiologia, 15: 432–438.
17. ZICSI, A. (1977): Die Bedeutung der Regenwürmer bei der Streuzersetzung in mesophilen Laubwäldern Ungarns. – P. Cent. Pir. Biol. Exp., 9: 75–84.
18. ZICSI, A. (1978): Nahrungsansprüche einheimischer Lumbriciden-Arten und ihre Bedeutung für die Ökosystemforschung in Ungarn. Pedobiologia, 18: 341–349.
19. ZICSI, A., HARGITAI, L. & POBOZSNY, M. (1971): Über die Auswirkung der Tätigkeit des Regenwurmes Lumbricus polyphemus Fitz. auf die Vernänderungen der Humusqualität im Boden. – Ann. Zool. Ecol. Anim., Hors Ser., 397–408.
20. ZICSI, A. & POBOZSNY, M. (1977): Einfluss des Zersetzungsverlaufes der Laubstreu auf die Konsumintensität einiger Lumbriciden-Arten. – Ecol. Bull. (Stockholm), 25: 229–239.